



REPÚBLICA DE CUBA

09/889480
REC'D 13 DEC 2000

WIPO

PCT

09/889480

CU 00 / 0000 4




Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número ciento noventa y seis del año mil novecientos noventa y nueve del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención por **ANTICUERPOS QUIMERICO, HUMANIZADO Y EL FRAGMENTO DE TIPO Fv DE CADENA SENCILLA QUE RECONOCE EL ANTIGENO C2. SU USO EN EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLORRECTALES**, con fecha dieciséis de noviembre de mil novecientos noventa y nueve, a las ocho horas ante meridiano, por Josefa Lombardero Valladares, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**, cuya invención fue creada por Cristina María Mateo de Acosta del Río; Lourdes Tatiana Roque Navarro; Alejo Morales Morales; Rolando Pérez Rodríguez; Marta Ayala Avila; Jorge V. Gavilongo Cowley; Marta Dueñas Porto; Hanssel Bell García; Enrique Rengifo Calzado; Normando Iznaga Escobar y Mayra Ramos Zuzarte.

~~ASIMISMO CERTIFICO:~~ Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

~~TAMBIEN CERTIFICO:~~ Que la Memoria Descriptiva, Reivindicaciones y Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

~~Y a petición de Norkis Arteaga Morales, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los ocho días del mes de noviembre de dos mil.~~


Lic. América N. Santos Riveras
Directora General

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

ANTICUERPOS QUIMERICO, HUMANIZADO Y EL FRAGMENTO DE TIPO FV DE CADENA SENCILLA QUE RECONOCE EL ANTIGENO C2. SU USO EN EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLORRECTALES.

5 Sector Técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología en particular con nuevos anticuerpos recombinantes obtenidos mediante el empleo de la ingeniería genética, específicamente con el anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado y un fragmento de tipo Fv de cadena sencilla obtenidos a partir del anticuerpo murino ior C5.

- 10 La invención se relaciona además con los anticuerpos y fragmentos que reconocen epitopos expresados en un antígeno denominado ior C2 y que se ha caracterizado como un complejo glicoproteico que se expresa en células colorrectales malignas y normales. La invención revela las secuencias del correspondiente sitio de unión al antígeno.

- 15 La invención se relaciona con las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos monoclonales útiles en el marcaje con isótopos radioactivos para el diagnóstico y la terapia de neoplasias malignas.

Técnica anterior

- 20 Han sido probadas diferentes formas de tratamiento del carcinoma colorrectal siendo la resección quirúrgica del tumor la única que ha resultado curativa. La cirugía permite alcanzar altos porcentos de sobrevida en los casos que son detectados tempranamente, pero desafortunadamente la mayoría de los casos es diagnosticada en etapas en las que el tumor ya ha hecho metástasis.

- 25 Actualmente la estrategia a seguir para aumentar la sobrevida general ante la enfermedad abarca el diagnóstico, la terapéutica y la epidemiología. Los investigadores están evaluando métodos que permitan diagnosticar precozmente la enfermedad, o sea, en estados en que aún no se haya producido la diseminación hacia las capas más externas del órgano, etapas en las que aún es quirúrgicamente curable. De la misma forma el conocimiento de los factores epidemiológicos y el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos más eficaces
30 contribuirán al incremento de la sobrevida.

- El uso de anticuerpos monoclonales (AcMs) o fragmentos de estos, marcados con isótopos radioactivos para la detección del cáncer por métodos inmunogammagráficos ha centrado la atención en los proyectos de investigación de los últimos años. Los AcMs han mostrado potencial suficiente para servir como portadores de radioisótopos y dirigirlos hacia los
35 antígenos tumor asociados.

- Algunos anticuerpos radiomarcados han sido utilizados para detectar tumores que están asociados con el antígeno carcinoembrionario (CEA). Los anticuerpos contra el CEA, marcados con I-131 o I-125 son utilizados para detectar tumores que producen CEA o están asociados con este marcador (Patentes US No. 3 663 684, US No. 3 867 363 y US No. 3
40 927 193). También se conoce que los AcMs pueden ser marcados con Tc-99m con el objetivo de conformar agentes para el diagnóstico "in vivo".

- Después de más de 15 años de desarrollada la tecnología de hibridomas para la obtención de AcMs murinos (Koehler G., Milstein, C (1975) Nature 256, 495-497), los cuales son usados para la investigación y el diagnóstico de enfermedades, los mismos no han
45 demostrado ser eficaces en la terapéutica de enfermedades y esto ha sido en gran medida debido a la corta vida media de estos en humanos así como al pobre reconocimiento de las funciones efectoras murinas por el sistema inmune humano y además por la respuesta inmunológica que provoca el origen murino de los mismos al ser inyectados en pacientes.

El desarrollo de la tecnología de ingeniería de genes ha revolucionado el potencial de los AcMs, ya que manipulando los genes de las inmunoglobulinas es posible hacer modificaciones en los anticuerpos con el objetivo de disminuir o eliminar la antigenicidad de los mismos, así como mejorar sus funciones efectoras cuando son usados en el

tratamiento o diagnóstico de determinadas patologías. Estas manipulaciones tienen como objetivo esencial disminuir al máximo las diferencias en cuanto a propiedades inmunológicas entre el anticuerpo murino y una inmunoglobulina humana, sin alterar la especificidad por el antígeno (Morrison S.L et al (1989) Adv Immunol. 44, 65-92). Recientemente se han desarrollado varios métodos para humanizar anticuerpos de ratón o de rata y así disminuir la respuesta xenogénica contra proteínas extrañas en el uso humano. Uno de los primeros intentos para reducir la antigenicidad ha sido generando anticuerpos "quiméricos", en los cuales los dominios variables de las proteínas murinas fueron insertados en dominios constantes de moléculas humanas, con lo cual no solo se logra la disminución de la inmunogenicidad sino también el mejoramiento de funciones efectoras ya que las mismas son humanas y por tanto reconocidas por el sistema inmune (Morrison S.L et al (1984) P.N.A.S, USA 81, 6851-6855). Estas moléculas quiméricas mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno y su región constante no es inmunogénica, aunque mantiene la inmunogenicidad contra la región variable murina.

Otros autores han logrado disminuir aún más la inmunogenicidad, insertando las Regiones determinantes de la Complementariedad (CDRs) de los anticuerpos alogénicos sobre los marcos (FRs) de inmunoglobulinas humanas (Jones P.T. et al (1986) Nature 321, 522-524, Verhoeven M et al (1988) Science 239, 1534-1536). En algunas aplicaciones de este método (Rietchmann L. et al (1988) Nature 332, 323-327; Queen C. et al (1989) P.N.A.S. USA 86, 10029-10033) los seis CDRs del anticuerpo murino fueron transplantados a FRs humanos, sin embargo las afinidades de unión al antígeno de estos anticuerpos "humanizados" disminuyó, y solo en algunos casos se logró recuperar la afinidad original en estos anticuerpos "humanizados" cambiando nuevamente algunos residuos de los FRs humanos por murinos (Tempest P.R (1991) Bio/Tech. 9, 266-272).

Mateo et al. (US Patent Number US05712120) describe un procedimiento para la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos. Según se describe en el procedimiento, las modificaciones están restringidas a los dominios variables y específicamente a los FRs murinos de los anticuerpos quiméricos. Mas aún, las modificaciones se realizan solamente en aquellas regiones de los FRs que tienen una estructura de hélice anfipática y que por tanto son potenciales epitopos reconocidos por las células T. El método propone sustituir los residuos murinos dentro de las regiones anfipáticas por los aminoácidos que se encuentren en la misma posición en las inmunoglobulinas humanas, quedando excluidos de estos cambios aquellos residuos que están involucrados en la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno, es decir la zona de Vernier, las estructuras canónicas de los CDRs y los aminoácidos en la interface entre las cadenas pesada y ligera.

El anticuerpo modificado por el método descrito por Mateo et al. Retiene la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno del anticuerpo original y resulta menos inmunogénico, lo cual incrementa su utilidad terapéutica. Mediante este procedimiento se logra con un pequeño número de mutaciones anticuerpos modificados que muestran una reducción de la inmunogenicidad comparados con el anticuerpo quimérico.

El AcM ior C5, anticuerpo de origen murino de isotipo IgG1 generado a partir de la inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116

(adenocarcinoma colorrectal), reconoce un antígeno expresado preferencialmente en la superficie y citoplasma de células colorrectales malignas y normales. No reconoce a los antígenos CEA, Lewis a, Lewis b, Lewis a sialilado, ni a los antígenos de membrana de las células mononucleares periféricas, ni de los glóbulos rojos (Vázquez A. M. et al, Hybridoma 11, pág. 245-256, 1992).

Estudios de western blotting utilizando extractos de membrana de la línea SW1116 mostraron que este AcM reconoce un complejo glicoproteico al que se denominó C2, compuesto por una banda mayor de 145 KDa y una menor de 190 KDa (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993).

También mediante el empleo de las técnicas de ingeniería genética se construyen fragmentos recombinante a partir de anticuerpos monoclonales. Existen numerosos reportes que validan la utilización de los diferentes tipos de fragmentos de anticuerpos tanto en el diagnóstico "in vivo" como en la terapia de diversas enfermedades.

Ira Pastan entre otros (EP 0796334 A1) describe la construcción de fragmentos de tipo Fv de cadena sencilla usando las regiones variables de anticuerpos que reconocen específicamente el carbohidrato relacionado con el antígeno Lewis Y. Basándose en dichos fragmentos desarrolla un método para detectar células portadoras de dicho antígeno, también aporta evidencias del efecto inhibidor que estos fragmentos ejercen sobre células portadoras del antígeno.

Divulgación de la Invención

Síntesis de cDNA y amplificación por PCR de las regiones variables del anticuerpo murino IOR C5.

El RNA citoplasmático fue obtenido de 10^6 células de hibridoma del IOR C5 (Vázquez A.M. et al. Year Immunol, Basel, Karger, vol 7, pág. 137-145, 1993). El anticuerpo murino IOR C5 fue obtenido por inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116 (Vázquez A.M. et al, Hybridoma 11, pág 245-256, 1992). El método usado para la extracción del RNA fue el descrito por Faloro et al (Methods in Enzimology 65, 718-749, 1989).

La síntesis de DNA complementario (cDNA) consistió en unir 5 μ g de RNA obtenido con 25 pmoles del oligo diseñado para hibridizar con el principio de la región constante de las IgG1 murinas y para la cadena ligera que hibridice en región constante kappa murina, 2.5 mM de cada deoxinucleótido (dNTPs), 50 mM Tris-Hcl pH 7.5, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 8 mM MgCl₂ y 15 unidades de inhibidor de RNasa en un volumen total de 50 μ l. Esta mezcla es calentada a 70°C, por 10 minutos y enfriada lentamente hasta 37°C. Entonces se le añaden 100 unidades de enzima transcriptasa reversa y se incuba a 42°C por una hora.

Las regiones variables de cadena ligera (VK) y de cadena pesada (VH) fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Brevemente, 5 μ l de cDNA de VH o de VK se mezclan con 25 pmoles de oligonucleótidos específicos, 2.5 mM de cada dNTP, 5 μ l de solución tampón 10X para la enzima DNA polimerasa y 1 unidad de esta enzima. Las muestras fueron sometidas a 25 ciclos de PCR con temperaturas de 94°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C, 1 min., con una incubación final de 5 minutos a 72°C.

Clonaje y secuenciación del cDNA amplificado.

Los productos de las PCRs de VH y VK fueron clonados en el vector TA (TA Cloning kit. Promega, USA). Los clones resultantes fueron secuenciados por el método dideoxi-secuencia usando T7 DNA Polimerasa y el juego de reactivos de la casa comercial Pharmacia (T7 sequencing kit, Pharmacia, Sweden).

Construcción de genes quiméricos.

Los genes de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras fueron obtenidos por restricciones enzimáticas de las construcciones intermedias en el vector TA y clonados en los respectivos vectores de expresión (Coloma M.J. et al., Journal of Immunological Methods, 152, 89-104, 1992).

Los genes VH fueron cortados del vector TA por digestión enzimática con EcoRV y NheI y clonados en un vector de expresión (PAH 4604), que tiene incluida una región constante IgG1 humana y como marcador de selección el gen de resistencia al histidinol. La construcción resultante es el C5VH-PAH4604. Los genes VK fueron cortados del vector TA por digestión con las enzimas EcoRV y Sall, para ser clonados en el vector PAG4622.

Este vector tiene un gen de resistencia al gpt y la región constante utilizada fue la kappa humana. La construcción genética resultante es el C5VK-PAG4622.

Expresión del anticuerpo quimérico.

Células NSO fueron electroporadas con 10ug de C5VH-PAH4604 y 10 ug de C5VK-PAG4622 linealizados con enzima PvuI. Los DNAs fueron mezclados, precipitados con etanol y disueltos en 25 ul de agua. Aproximadamente 10⁷ células crecieron hasta semi-confluencia, colectadas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml de D'MEN junto con el DNA en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo las células fueron sometidas a un pulso de 170 volts y 960 uFaradios y dejadas en hielo por 30 minutos. Las células se cultivan en 20 ml de D'MEN con 10% de suero fetal de ternera y se dejan 24 horas recuperándose del pulso eléctrico. A este tiempo, se siembran las células en placas de 96 pozos con medio selectivo que contiene 10mM de histidinol. Los clones transfectados se hicieron visibles a los 10 días de añadido el medio selectivo.

La presencia del anticuerpo humano en las placas fue detectada por ELISA. Las placas fueron recubiertas con un anticuerpo obtenido en chiva que reconoce específicamente cadena gamma humana, los pozos fueron lavados con PBS-T (solución salina tamponada que contiene 0.02% de Tween pH 7.5), 100 ul de sobrenadante de medio de cultivo fueron añadidos a cada pozo de las placas de ELISA y dejados una hora a 37 °C. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se le añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena kappa humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina se dejó a temperatura ambiente por una hora. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato dietanolamina. Después de media hora la absorbancia fue medida a 405 nm

Construcción del Ac humanizado ior C5h por humanización de epitopos T.

Predicción de epitopos T.

Las secuencias de los dominios variables del ior C5 son analizadas con el Programa AMPHI (Berzofsky et al (1987) The Journal of Immunology 138, 2213-2229), el cual permite la identificación de segmentos de 7 ó de 11 aminoácidos con una estructura de hélice anfipática, a la cual se ha relacionado la inmunogenicidad T. Además se usó el programa SOHHA que predice también zonas de hélices hidrofóbicas. (Elliot et al., J.Immunol. 138: 2949-2952, (1987). Estos algoritmos predicen fragmentos relacionados con la presentación de epitopos T en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino ior C5.

Análisis de Homología con inmunoglobulinas humanas.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del ior C5 son comparadas con las secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas reportadas, para identificar la inmunoglobulina humana que posea mayor homología con la molécula murina sometida a análisis.

Las bases de secuencias humanas utilizadas fueron las reportadas en GeneBank y EMBL, ambas bases de datos se encuentran disponibles en internet. El programa que se utiliza para determinar la homología entre secuencias es el PC-DOS HIBIO PROSIS 06-00, Hitachi.

Análisis para la reducción de inmunogenicidad.

La esencia del método radica en lograr una reducción de la inmunogenicidad por la humanización de los posibles epitopos T, esto con un mínimo de mutaciones en los FRs, específicamente en aquellos segmentos que tienen una estructura de hélice anfipática, quedando excluidas aquellas posiciones involucradas con la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno.

Según el método, se comparan las secuencias de las regiones variables de VH y VL de la inmunoglobulina murina con la humana más homóloga y se identifican los residuos que difieren entre la secuencia murina y la secuencia humana, sólo en los segmentos anfipáticos que quedan dentro de la región de los marcos o "frameworks" (FRs) (Kabat E.(1991)

- 5 Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health), estos residuos "murinos" serán los susceptibles de ser mutados por aquellos que se encuentran en la misma posición en la secuencia humana.

Los residuos que se encuentran en las posiciones de los FRs responsables de las estructuras canónicas o en la zona de vernier, no pueden ser mutados, pues pueden afectar la estructura tridimensional del dominio variable del anticuerpo y por tanto afectar su unión al antígeno. Información adicional sobre la influencia de las sustituciones que se hacen en la estructura terciaria, pueden ser obtenidas por modelaje molecular de las regiones variables.

Clonaje y expresión del anticuerpo humanizado ior C5h en células NSO.

- 15 Una vez obtenidas las construcciones genéticas correspondientes al ior C5h por humanización de epitopos T, estas fueron clonadas en los vectores de expresión, de manera similar a la descrita anteriormente en el caso de la construcción del Ac quimérico, obteniéndose las construcciones genéticas siguientes: C5Vkh-PAG4622 y C5Vhhu-PAH4604. La transfección de estos genes a las células NSO fue exactamente con las mismas condiciones que las descritas anteriormente en el caso del anticuerpo quimérico.

Obtención del Fragmento de tipo Fv de cadena sencilla.

Construcción y expresión del scFv.

- 25 La estrategia contempla una primera amplificación por PCR que modifica las regiones VH y VL secuenciadas, incluyendo los sitios para endonucleasas de restricción para el clonaje en los vectores de expresión. En la amplificación se emplean oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia exacta.

Después de amplificadas, las regiones variables son purificadas y digeridas con las correspondientes enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN se purifican y se ligan secuencialmente con los vectores de expresión. Posteriormente dichas construcciones genéticas son expresadas en E. Coli, según los métodos convencionales.

- 30 En el proceso de extracción de la proteína desde las células productoras, se realiza mediante un proceso de ruptura por ultrasonido que permite separar fracción soluble e insoluble, combinado con electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, transferencia a nitrocelulosa y Western blot.

La proteína se logra semipurificar por proceso que incluye: (1) separación del material soluble e insoluble por ultrasonido y centrifugación, (2) lavados a bajas molaridades de Urea y solubilización a altas molaridades de Urea. A partir del material solubilizado se purifica la proteína por cromatografía de afinidad a metales iónicos. Posteriormente se renaturaliza vs la solución tampón

Ejemplos

- En los siguientes ejemplos todas las enzimas de restricción o modificación utilizadas, así como reactivos y materiales fueron obtenidos de fuentes comerciales a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Quimérico.

Los cDNAs de VH y VK fueron obtenidos a partir del RNA del hybridoma productor del anticuerpo ior C5 y usando la enzima transcriptasa reversa.

5 Los oligonucleótidos específicos usados como cebadores fueron:

Para VH:

5'AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC 3'

Para VK:

5'GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG 3'

10

El cDNA de las cadenas VH y VK fueron amplificadas por (PCR) con la enzima Taq polimerasa y utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción ECORV/NHEI, para VH y ECORV/SALI para VK, los oligonucleótidos específicos usados como cebadores en esta reacción de amplificación fueron:

15 Para VH:

Oligonucleótido 1:

5'GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT 3'

Oligonucleótido 2:

5'TGGGTCGAC(AT)GATGGGG(GC)TGTTGTGCTAGCTGAGGAGAC 3'

20

Para VK:

Oligonucleótido 1:

5'GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)3'

Oligonucleótido 2:

25 5'AGCGTCGAGTTACGTTT(TG)ATTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC3'

El producto de la PCR fue clonado en el vector TA (TA cloning kit de la Invitrogen). Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). Las secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo 2 de Kabat.

30

Posteriormente, la cadena VH fue digerida ECORV/NHEI y la VK ECORV/SALI, y clonadas en los vectores previamente digeridos con las mismas enzimas PAH4604 y PAG4622, para VH y VK respectivamente. Estos vectores fueron donados por Sherie Morrison (UCLA, California, USA). Los mismos son usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores. El vector PAH 4604 tiene incluida la región constante humana IgG1 y el PAG 4622 humana Ck (Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction., M. Josefina Coloma et al, Journal of Immunological Methods, 152 (1992), 89-104) Una vez clonadas la regiones VH y VK del ior C5 en los vectores anteriores, se formaron las construcciones VHC5-PAH4604 y VKC5-PAG4622.

35

Las células NSO fueron electroporadas con 10 µg del vector quimérico C5VH-PAH4604 y 10 µg de C5VK-PAG4622, los mismos fueron linealizados por digestión con PVUI. Los DNA fueron mezclados, precipitados en etanol y disueltos en 25 µl de agua. Aproximadamente 10⁷ células NSO fueron crecidas hasta semiconfluencia, obtenidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5-1.0 ml DMEN conjuntamente con el DNA digerido en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo, a las células se les aplicó un pulso de 170 volts y 960 µF (Gene-Pulser, Bio-Rad) y se dejaron en hielo por 30 minutos. Las células fueron colocadas en 20 ml DMEN más 10 % suero fetal bovino y se

45

dejaron en estas condiciones por 48 horas para que se recuperaran. Después las células fueron distribuidas en placas de 96 pozos y se les aplicó medio selectivo (DMEN, 10 % suero fetal bovino, 10 mM de histidinol). Los clones transfectados se detectaron visualmente 10 días después. La expresión de los anticuerpos quiméricos en los pozos que contienen los clones transfectados fue detectada por ELISA. Las placas de Microtítulos de 96 pozos para ELISA fueron recubiertas con el conjugado anti IgG humana, cadena gamma específica (Sera Lab). Después de lavarse con PBST (phosphate buffered saline) que contiene 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 µl de medio de cultivo de las placas que contienen los transfectomas se le adicionaron a cada pozo de la placa de microtítulos 1 hora a 37°C.

Después las placas se lavan con PBST y se adiciona el anticuerpo anti cadena Kappa humana conjugado con fosfatasa alcalina, cadena ligera específica (Sera-Lab) y se incuba a 37°C durante 1 hora. Los pozos se lavan con PBST y se adiciona la solución tampón que contiene como sustrato la dietanolamina. La absorbancia fue medida a 405 nm.

Ejemplo 2. Obtención de diferentes versiones del Anticuerpo Humanizado.

Las secuencias de VH y VK y C5 fueron comparadas con una base de datos de secuencias humanas, obteniéndose la secuencia humana de mayor homología con el anticuerpo C5.

Posteriormente en ambas secuencias (VH y VK) se determinaron las regiones anfipáticas o posibles epítopos T.

En el caso de la región VH se introdujeron mutaciones en las posiciones 10 y 17, donde se sustituyeron los aminoácidos ASP y SER por GLY y THR respectivamente. Estas mutaciones se realizaron por sobrelapamientos de PCRs usando los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, en un primer PCR y después se sobrelapó el resultado de los mismos en otro PCR, usando solo los oligonucleótidos 2 y 4 cuyas secuencias se muestran a continuación (Kamman, M., Laufs, J., Schell, J., Gronemborg, B. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). Nucleic Acids Research 17:5404. (1989))

Oligonucleótidos para las mutaciones 10 y 17 de la cadena pesada.

Oligo 1:

5' GAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGACACTTTCACTCACC 3'

Oligo 2:

5' TGGGTCGAC(AT)GATGGGG(GC)TGTTGTGCTAGCTGAAGAGAC 3'

Oligo 3:

5' GGTGAGTGAAAGTGTCTGAGAAGGTTTCACCAGGCCAGGTCCTGACTC 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT 3'

Una vez secuenciadas y verificadas las anteriores mutaciones, a los DNAs que portaban las mismas, se les introdujo en las posiciones 43 y 44 LYS y GLY, sustituyendo a los aminoácidos ASN y LYS. A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, descritos para estas mutaciones. El sobrelapamiento de los productos de los PCRs se hizo de la misma manera descrita anteriormente. Las mutaciones fueron verificadas por secuencia. Esta construcción genética se le denominó C5VHhu.

Oligonucleótidos para las mutaciones 43 y 44 de la cadena pesada.

Oligo 1:

5' CAGTTTCCAGGAAAAGGACTGGAATGGATG 3'

Oligo 2:

5' TGGGTCGAC(AT)GATGGGG(GC)TGTTGTGCTAGCTGAAGAGAC 3'

Oligo 3:

5' CATCCATTCCAGTCCTTTTCCTGGAAACTG 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT 3'

- 5 Para la cadena VK se realizaron mutaciones en las posiciones 15, 45 y 63 sustituyendo ILE, LYS y THR, por LEU, ARG y SER, respectivamente.

Las mutaciones fueron introducidas de la misma manera que en la cadena pesada, a continuación se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Esta construcción genética se le nombró C5Vkh.

- 10 **Oligonucleótidos para la mutación I15 de la cadena ligera.**

Oligo 1:

5' TTGTCGGTTACCCTTGGACAACCAGCC 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

- 15 **Oligo 3:**

5' GGCTGGTTGTCCAAGGGTAACCGACAA 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GT

Oligonucleótidos para la mutación K45 de la cadena ligera.

- 20 **Oligo 1:**

5' GGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTAT 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

- 25 5' ATAGATTAGGCGCCTTGGAGACTGGCC 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GT

Oligonucleótidos para la mutación T63 de la cadena ligera.

Oligo 1:

- 30 5' CCTGACAGATTCAAGTGGCAGTGGATCA 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

5' TGATCCACTGCCACTGAATCTGTCAGG 3'

- 35 **Oligo 4:**

5' GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GT

Una vez realizadas las mutaciones, estas fueron verificadas por secuencia.

- 40 Las cadenas VK y VH humanizadas fueron clonadas en los vectores PAG 4622 y PAH4604, formando las construcciones C5VHhu-PAH4604 y C5Vkh-PAG4622 respectivamente.

Las células NSO fueron electroporadas con 10 µg del vector humanizado C5VHhu-PAH4604 y 10 µg de C5Vkh-PAG4622, los mismos fueron linealizados por digestión con PVUI.

- 45 El proceso de electroporación y detección de los clones que expresaban el anticuerpo humanizado por C5h fue idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico.

Ejemplo 3. Obtención del Fragmento de tipo Fv de cadena sencilla.

Construcción de un fragmento tipo scFv (VH-linker-VL) a partir de los dominios variables (VH y VL), del AcM iorC5 clonaje en vector adecuado para su expresión en E.coli.

5 Procedimiento (a). Construcción del scFv.-

La estrategia contempla una primera amplificación por PCR que modifica las regiones VH y VL secuenciadas, incluyendo los sitios para endonucleasas de restricción para el clonaje en los vectores de expresión pPACIB.7plus y pPACIB.9plus. En la amplificación se emplean los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia exacta y que se muestran a continuación.

10

CADENA PESADA

4066: EcoRV-FR1-VH

5'.GGGATATCTGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGA..3'

4255: EcoRV-FR4-VH

15 5'..CAGGATATCGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC..3'

CADENA LIGERA

2938: Sal I-FR1-VL

5'.CGTCGACGATATCCAGATGAC(AC)CA(GA)ACT(AC)C..3'

20 2935: Apa I- FR4-VL

5'.ATGGGCCCCTTT(TC)A(TG)(TC)TCCAGCTTGGT..3'

Después de amplificadas, las regiones fueron purificadas, y digeridas VH (EcoRV) y VL (SalI-ApaI). Los fragmentos de ADN fueron purificados y esta vez y ligados

25 secuencialmente con los vectores denominados pPACIB.9plus y pPACIB.7plus, previamente digerido con las enzimas de restricción antes mencionadas. El pPACIB.7plus es un plásmido modificado para exportar hacia el periplasma, proteínas heterólogas cuyos genes son expresados en *E.coli*. El mismo consta de las secuencias regulatorias adecuadas para lograr tal función, entre ellas: secuencia promotora (triptofano), secuencia para

30 péptido señal (ompA) con vistas a la secreción de la proteína clonada, la secuencia del péptido de unión reportada por Chaudahry et. al en 1990 y un dominio compuesto por 6 histidinas que se codifica en el N-terminal de la proteína madura, para facilitar la purificación posterior de la misma (Gavilondo, J.V. et al. Proceedings of the IV Annual

35 Conference on Antibody Engineering. IBC Conferences Inc. Coronado, CA. December 8-10, 1993). El pPACIB.9plus (FIGURA 1) es un plásmido modificado para expresar proteínas de fusión en el citoplasma, cuyos genes son expresados en *E.coli*. El mismo consta de las secuencias regulatorias adecuadas para lograr tal función, entre ellas: secuencia promotora (triptofano), fragmento de 27aa derivados de la IL-2h con vistas a una

40 eficiente expresión de la proteína a partir del gen clonado, y un dominio compuesto por 6 histidinas que se codifica en el C-terminal de la proteína madura, para facilitar la purificación posterior de la misma (Gavilondo, J.V. et al. Proceedings of the IV Annual

Conference on Antibody Engineering. IBC Conferences Inc. Coronado, CA. December 8-10, 1993).

El producto de las reacciones de ligazón fue empleado para la transformación de células competentes de *E. coli* (cepa MC1061), que se plaquearon sobre medio sólido selectivo y crecieron a 37°C. Para la selección de los vectores recombinantes, un número de colonias bacterianas fueron inoculadas en medio líquido y sometidas a un proceso de extracción de ADN plasmídico (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición de 1989, por Sambrook, Fritsch y Maniatis). El ADN plasmídico fue digerido con las endonucleasas EcoRV, SalI/ApaI, XhoI/ApaI según la etapa del clonaje, y después de aplicados a un gel de agarosa y visualizados con luz ultravioleta, los clones recombinantes se seleccionaron entre aquellos que presentaron dos bandas como patrón de digestión, una correspondiente al pPACIB.7 y 9plus (aprox. 2.9kb), y la segunda al dominio en cuestión (aprox. 320pb VH o VL y 720pb para el scFv). Para el dominio VH se chequeó orientación de la inserción mediante secuenciación del ADN.

Procedimiento (b). Expresión en *E. coli* del scFv obtenido a partir de los genes de los dominios variables del AcM ior C5

Se transformaron cuatro cepas de *E. coli* (TG1, coliB, W3110 y MM294) para estudios de expresión del gen clonado, empleando para ello dos de los plásmidos recombinantes seleccionados en (a). Básicamente, las bacterias recombinantes fueron crecidas en medio líquido (LB) con ampicilina, toda la noche a 37°C. A partir de estos cultivos se inocularon cultivos frescos conteniendo ampicilina, que fueron incubados por 3 hrs a 37°C. Pasado este tiempo se indujo la expresión de la proteína al añadir al cultivo ácido beta-indolacrílico (inductor del promotor triptófano). El análisis de las muestras de biomasa en geles de SDS-poliacrilamida al 12% indicó que bajo estas condiciones se expresa una proteína de aproximadamente 28kDa en la fracción periplasmática para la construcción en el pPACIB.7plus y de unos 30 kDa para el clon recombinante en pPACIB.9plus, cuyo nivel de expresión en la cepa TG1 oscila entre el 6-11% de la proteína total bacteriana (Figura 1). Se demostró mediante un Western blot (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición de 1989, por Sambrook, Fritsch y Maniatis) con un antisuero obtenido en conejo contra el fragmento Fab del AcM ior C5, e inmunopurificado, que esta proteína correspondía al scFv iorC5

Ejemplo 4. Obtención del scFv a partir de cultivos bacterianos, renaturalización y ensayos de reconocimiento al antígeno.

Procedimiento (a). Extracción y renaturalización del scFv iorC5 a partir del clon recombinante en pPACIB.9plus.

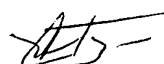
En el proceso de extracción de la proteína desde las células productoras, mediante un proceso de ruptura por ultrasonido y que permite separar fracción soluble e insoluble, combinado con electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, transferencia a nitrocelulosa y Western blot, evidenció que la proteína se queda en la fracción insoluble bacteriana.

Dada estas circunstancias la proteína se logra semipurificar por proceso que incluye: (1) separación del material soluble e insoluble por ultrasonido y centrifugación, (2) lavados a bajas molaridades de urea (2 M) y (3) solubilización a altas molaridades de Urea (6 M). A partir del material solubilizado se purifica la proteína por cromatografía de afinidad a metales iónicos. Posteriormente se renaturaliza vs la solución tampón.

Procedimiento (b). Ensayo de unión a células tumorales del fragmento scFv-iorC5

Lineas celulares:

- Las líneas empleadas se obtuvieron del Centro de Inmunología Molecular. La línea celular de adenocarcinoma de colon, SW948 fue cultivada en medio L-15 suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C en 6 % CO₂. Las líneas celulares Raji (linfoma Burkitt humano) y Hut 78 (línea celular T humana) se emplearon como controles negativos. La línea Raji se cultivó en RPMI 1629 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y la línea Hut 78 se cultivo en RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y mantenidas a 37°C.
- Las suspensiones celulares se ajustaron a una concentración de 10⁶ células/ml en tampón fosfato salino (PBS) conteniendo 1 % de albúmina de suero bovina. Se aplicaron 10 µl de la suspensión celular a cada pocillo. Las láminas se secaron en aire libre de polvo durante 3 horas y luego se fijaron con una solución de acetona-metanol (1:1) durante 5 minutos, seguido por una hidratación en TBS por 10 minutos. Finalmente las células fueron procesadas mediante un ensayo inmunocitoquímico.
- La actividad del fragmento scFv iorC5 se determinó mediante un ensayo inmunocitoquímico, empleando la técnica de la inmunoperoxidasa. Las células se incubaron con el scFv iorC5 durante 2 horas a 37°C, seguido por una incubación con el suero anti Fab y con un conjugado anti-ratón peroxidasa de rábano picante (HRPO), cada uno durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de localización de la peroxidasa se visualizaron con una solución que contiene 5 mg de 3-3 diaminobencidina, 5 ml de TBS y 5 µl de H₂O₂ al 30 %. Entre las incubaciones las láminas se lavaron con TBS frío. A continuación se sumergieron en agua, se contrastaron con Hematoxilina de Mayer y se montaron con Bálsamo de Canadá. En cada experimento se incluyeron controles celulares positivos y negativos.
- Los estudios inmunocitoquímicos revelaron que este fragmento es negativo para las líneas celulares testadas, excepto para la línea SW948, que mostró un marcaje moderado en comparación con el Acn completo, demostrándose que existe un reconocimiento específico del scFv iorc5 por esta línea. El marcaje estuvo predominantemente asociado a la membrana y al compartimiento citoplasmático en las células malignas del colon.



35 Norkis Arteaga
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

REIVINDICACIONES

1. Un Anticuerpo humanizado denominado iorC5h derivado del anticuerpo monoclonal murino producido por el hibridoma con número de depósito ECCC 97061101, específico contra el antígeno ior C2 expresado en células colorrectales malignas y normales, caracterizado porque las secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA**CDR1:** S A Y N W H**CDR2:** Y I S Y N G T T S Y N P S L K S**CDR3:** N D E R A W F A Y**CADENA LIGERA****CDR1:** K S S Q S L L D S D G K T Y L N**CDR2:** L V S K L D S**CDR3:** W Q G T H F P H T

2. Un Anticuerpo humanizado denominado iorC5h específico contra el antígeno ior C2, expresado en células colorrectales malignas y normales, caracterizado porque las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA**FR1:** D V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V T G Y S I T**FR2:** W I R Q F P G K G L E W M G**FR3:** R I S I T R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R**FR4:** W G Q G T L V T V S A**CADENA LIGERA****FR1:** D V V M T Q T P L T L S V T L G Q P A S I S C**FR2:** W L L Q R P G Q S P R R L I Y**FR3:** G V P D R F S G S G S G T D F A L K I R R V E A E D L G V Y Y C**FR4:** F G G G T K L E I K R K S T L T G

3. Un Anticuerpo humanizado denominado ior C5h según la reivindicación 2 caracterizado porque en las regiones de los marcos de las cadenas pesada y ligera contienen cualesquiera de las siguientes mutaciones:

CADENA PESADA:

Posición 10 ASP por GLY

Posición 17 SER por THR

Posición 43 ASN por LYS

Posición 44 LYS por GLY

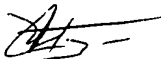
CADENA LIGERA:

Posición 15 ILE por LEU

Posición 45 LYS por ARG

Posición 63 THR por SER

4. Un Anticuerpo humanizado denominado ior C5h según las reivindicaciones 1-3 caracterizado porque contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana.
5. Un fragmento de anticuerpo de tipo Fv de cadena sencilla, caracterizado porque contiene las regiones variables de cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1-3.
6. Una línea celular caracterizada porque expresa el anticuerpo humanizado de la reivindicación 1.
7. Una línea celular caracterizada porque expresa cualesquiera de los anticuerpos humanizados de la reivindicación 2.
8. Una línea celular caracterizada porque expresa cualesquiera de los anticuerpos humanizados de la reivindicación 3.
9. Composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque contiene uno de los anticuerpos monoclonales o el fragmento de las reivindicaciones de la 1-4 y un excipiente apropiado para su aplicación.
10. Composición farmacéutica para la localización e identificación "*in vivo*" de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque contiene uno de los anticuerpos monoclonales o el fragmento de las reivindicaciones de la 1-4.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 caracterizada porque contiene además compuestos para el radiomarcaje de dichos anticuerpos, los cuales se mezclan con los mismos para producir una solución acuosa administrable.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, caracterizada porque los radiomarcadores pueden ser el tecnecio 99, el renio 186, el renio 188 o sus análogos.
13. Método diagnóstico para la detección de tumores malignos de colon, sus metástasis recidivas "*in vivo*" caracterizado por la administración de una composición fisiológicamente aceptable que contiene cualquiera de los anticuerpos de la reivindicaciones de la 1 a la 5 los cuales han sido previamente marcados con Tc-99m o sus y análogos y el monitoreo de la biodistribución de dicha composición por métodos de inmunogammagrafia.



Norkis Arteaga
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

pPACIB.9+10(ca.3.0Kb)

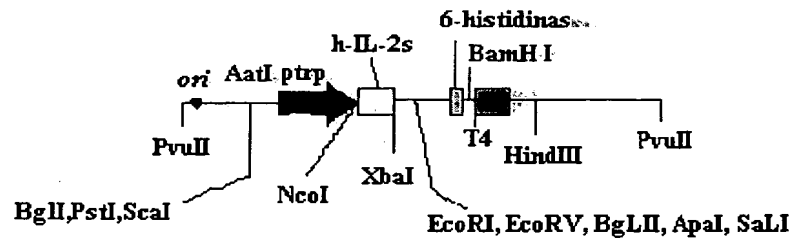
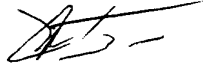


FIGURA 1


 Norkis Arteaga
 Representante Legal
 Centro de Inmunología Molecular